

41

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-131320
 (43)Date of publication of application : 09.05.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/553
 C12M 1/40
 C12N 11/14
 C12Q 1/02

(21)Application number : 2000-318529

(71)Applicant : RIKOGAKU SHINKOKAI

(22)Date of filing : 18.10.2000

(72)Inventor : ABE MASANORI
 HANADA HIROSHI
 NISHIMURA KAZUHIRO

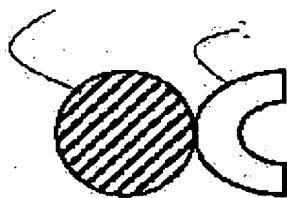
(54) FERRITE-IMMOBILIZED ORGANISM SUBSTANCE AND ITS MAKING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make magnetically manipulatable organism substances by immobilizing ferrite to the organism substances while keeping the activity of the organism substances and to realize wide applications thereof.

(a)

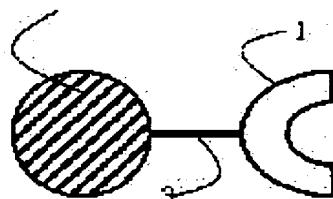
2



SOLUTION: Magnetism is given to organism substances by coveringly immobilizing ferrite on them by ferrite plating at a temperatures and pH for keeping active the organism substances including: physiologically active substances such as lipid, proteins, antigens, antibodies, enzymes, and hormones; receptors relative to chemical substances such as drugs; and drugs.

(b)

2



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-131320

(P 2002-131320 A)

(43) 公開日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(51) Int. Cl.

G01N 33/553
C12M 1/40
C12N 11/14
C12Q 1/02

識別記号

F I

G01N 33/553
C12M 1/40
C12N 11/14
C12Q 1/02

「マコード」(参考)

4B029
4B033
4B063

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2000-318529 (P 2000-318529)

(71) 出願人 899000013

(22) 出願日 平成12年10月18日 (2000.10.18)

財団法人 理工学振興会

東京都目黒区大岡山2-12-1

(72) 発明者 阿部 正紀

東京都目黒区大岡山2-12-1 東京工業
大学内

(72) 発明者 半田 宏

神奈川県横浜市緑区長津田町4259 東京工
業大学フロンティア創造共同研究センター
内

(74) 代理人 100077849

弁理士 須山 佐一

最終頁に続く

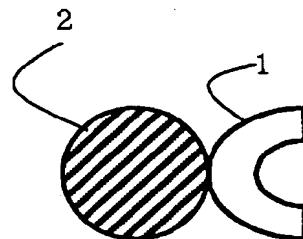
(54) 【発明の名称】 フェライト固定生体物質とその製造方法

(57) 【要約】

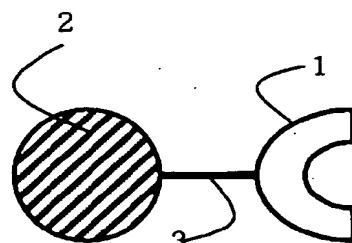
【課題】 生体物質の活性を保ったまま、生体物質にフェライトを固定して、生体物質を磁気的に操作できるようにし、その幅広い応用を可能にする。

【解決手段】 フェライトめっきを行うことにより、脂質やたんぱく質、抗原、抗体、酵素やホルモンなどの生理活性物質、薬剤などの化学物質に対する受容体、薬剤などの生体物質が活性を保つ温度およびpHで、生体物質にフェライトを固定被着することにより、磁性を付与する。

(a)



(b)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理活性を有する生体物質の前記生体活性を阻害しない部位にフェライトめっきによりフェライトが固定され、生理活性を有するとともに磁性を有することを特徴とするフェライト固定生体物質。

【請求項2】 前記フェライトの固定が、スペーサを介してなされていることを特徴とするフェライト固定生体物質。

【請求項3】 前記フェライトが、超常磁性を有することを特徴とするフェライト固定生体物質。

【請求項4】 生体物質に40°C以下、pH 7~9の条件のフェライトめっきを行って前記生体物質の所定部位にフェライトを固定する工程を有することを特徴とするフェライト固定生体物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、磁性体であるフェライトを固定して、磁性を付与した生体物質とその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 多くの通常の生体物質は非磁性であつて、磁気的に操作することができない。磁性体であるフェライトに生体物質を固定することができれば、生体物質を磁気的に操作することができる。生体物質を磁気的に操作可能にしたものとしては、図3に模式的に示したように、ポリマー微小球34の表面にフェライトめっきによって島状のフェライト層32を形成し、そのフェライトの表面に生体物質である抗体31を固定して作られたガン診断試薬などの酵素免疫試薬を挙げることができる（阿部：金属Vol. 68 p 290参照）。この酵素免疫試薬は、フェライトの磁性を利用して磁気分離ができるので、試薬として高速に処理できかつ高分解能が得られるという特徴を有している。また同様の構成を有するものとして磁気輸送抗ガン剤も知られている。これは磁気的な操作により抗ガン剤を患部のガン細胞に誘導し、ガン細胞を死滅させるものである。

【0003】 上記酵素免疫試薬および磁気輸送抗ガン剤の製造は、まずポリマーの微小球の表面にフェライトを固定したものを作つておき、その後に別の工程でフェライトの表面に生体物質を固定するという順序で行われる。これはフェライトの生成し固定する温度が高温であつたりpHが中性から大きく隔たつてゐるなどのために、フェライトの生成時に生体物質の活性を失わせることなく共存させることができないためである。例えばポリマー球にフェライトめっきを行う上記の場合には、反応溶液の温度が60~100°Cの条件下で行われる。この温度は、通常の生体物質の活性維持には適さない温度である。また水溶液中からのフェライトを生成する方法としては、フェライトを構成する金属イオンを有する水溶液にアルカリを加えてフェライトを生成させる共沈法が知

られているが、この場合にはアルカリ添加を行つてpHを例えば12以上にするなど、大きくする必要があるので、この場合も通常の生体物質の活性維持には適さない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、生体物質の活性を損なわずに生体物質に直接フェライトを生成し固定して磁性を付与することが望ましいことに着目し、その実現に向けて研究を行つた。個々の生体物質に直接フェライトを生成し固定することができれば、上記

10 酵素免疫試薬の場合における例えばポリマー球のような粒子に生体物質を固定したタイプの従来の磁気的操可能な生体物質とは異なつた新しいタイプの磁気的に操作可能な生体物質を得ることができ、幅広い応用が可能になると考えられる。

【0005】 生体物質の活性を損なわずに、生体物質にフェライトを生成固定するには、生体物質を有する水溶液中でのフェライトの生成を行い、フェライト生成の水溶液の温度およびpHを生体物質に適した範囲で行う必要がある。またフェライトの固定によって生体物質の活性

20 が失われるものであつてはならない。

【0006】 本発明はフェライトが固定され磁性を有する生体物質とその製造方法を提供するものであつて、上記したような問題点のそれぞれを解決して、発明を完成させることができたものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明のフェライト固定生体物質は、生理活性を有する生体物質の前記生体活性を阻害しない部位にフェライトめっきによりフェライトが固定され、生理活性を有するとともに磁性を有することを特徴とするものである。

【0008】 本発明のフェライト固定生体物質を図1に模式的に示す。図1の(a)において、生体物質1はフェライト2に固定されている。

【0009】 本発明において、生理活性を有する生体物質とは、生体内において活性を示し、生体内または生体外の他の物質との間に親和性あるいは相互作用を有する物質であつて、例えば脂質やたんぱく質、抗原、抗体、酵素やホルモンなどの生理活性物質、薬剤や環境ホルモンなどの化学物質に対する受容体など、生体が本来保有している物質のほかに、薬剤や内分泌搅乱物質など、外部から生体内に導入され、生体内における他の物質との間に活性を有するものや、これら生体物質を組合させて複合化した複合構造体を含めたものである。

【0010】 本発明において、生体物質のフェライトが固定される部位は、フェライトの固定によって、生体物質の保有する特異的な生体活性が損なわれない部位である。この部位には水酸基などを存在させ、フェライトめっきによりフェライトの固定を可能にしておくことができる。

50 【0011】 本発明のフェライト固定生体物質において

は、フェライトの固定を図1の(b)に示したようにスペーサ3を介して行ってもよい。スペーサはその一方の端が生体物質との結合性を有し、他方の端には水酸基など基を有しフェライトめっきの可能な基を有するもの用いるようにすることができる。またスペーサを設けることによって、固定されたフェライトと生体物質との間に空間的な距離を持たせ、生体物質にスペーサを介して固定されたフェライトが、生体物質の本来保有する特異的な活性に影響を及ぼさないようにすることもできる。

【0012】本発明において生体物質に固定するフェライトの組成は特に限定されず、生体に対する適合性の良好なマグネタイト(Fe_3O_4)のほか、必要に応じてマグネタイトの金属元素の一部を少なくとも1種類の他の金属元素で置換した各種フェライト組成が適用できる。

【0013】また生体物質に固定されたフェライトのサイズについては特に制限されないが、生体物質の活性に対する影響を少なくするために、生体物質のサイズに比べて大き過ぎないことが好ましく、また磁気的な操作を可能するために、生体物質のサイズに比べて小さすぎないことが好ましい。このため、例えば生体物質の1/10～10倍のサイズが好ましく、生体物質の1/5～5倍のサイズがより好ましい。

【0014】生体物質に固定されたフェライトの表面には、必要に応じて樹脂などの被覆がなされていてもよい。ここに用いる樹脂としては例えばグリシジルメタクリレートなどを好ましく用いることができる。

【0015】本発明の生体物質に固定されるフェライトとしては、超常磁性を有するものを好ましく用いることができる。生体物質が例えば1～5nm程度と小さい場合に、これに固定するフェライトのサイズをこれに合わせて小さく選んだ場合には、フェライトは熱擾乱影響を受け超常磁性を示すようになり、残留磁化や保磁力を持たなくなる。超常磁性であっても磁界を印加することにより磁気的操作が可能であり、また超常磁性であれば残留磁化や保磁力を持たないので、磁界のないときに磁気的な凝集の生じるおそれがない。

【0016】ところで本発明のフェライト固定生体物質の製造は、生体物質にフェライトめっきを行って生体物質の所定部位にフェライトを生成させ、固定することによって行うことができる。

【0017】生体物質に対するフェライトの固定は、2価鉄イオンを含む水溶液中に生体物質を浸漬して、2価鉄イオンなどの金属イオンを生体物質の所定の部位に吸着させ、この2価鉄イオンの酸化を行ってスピネルフェライト相を形成させるものである。本発明においては、フェライトめっきの条件として、pHを7～9と中性に近い条件に選ぶことにより、反応液の温度として40℃以下、室温あるいはそれ以下、さらには5℃程度の温度でもフェライトの固定が可能である。

【0018】このように本発明における反応液の温度範囲としては、40℃以下でフェライトめっきのための金属イオンの移動が可能な温度範囲を用いることができる。反応液の温度範囲としては40℃以下0℃以上がより好ましく、25℃以下0℃以上の範囲がさらに好ましい。また、このときの酸化条件としては攪拌によって空気中の酸素を取りこむ程度の緩やかな条件でよいので、生体物質を変質させたりその活性を損なったりすることなく、生体物質にフェライトを固定することができる。

10 【0019】図2は本発明のフェライト固定生体物質の製造方法の一実施形態を模式的に示す図である。図2において、生体物質1に対するフェライトの固定は、容器4内の2価鉄イオンを含む水溶液5中に生体物質1を浸漬して、2価鉄イオンなどの金属イオンを生体物質1の所定の部位に吸着させ、この2価鉄イオンの酸化を行ってスピネルフェライト相を形成させている。ここでpHの制御は温度/pHコントローラ7を用いてアルカリ添加によりpHを調整することによって行われている。また酸化はスターラにより液を攪拌して空気を取り込むことによって行っている。

20 【0020】本発明においては、生体物質の活性を損なわないよう、フェライトめっきの条件として、pHが7ないし9で行うことができ、また反応液の温度として室温25℃以下で行うことができる。例えば5℃程度の低温で行うこともできる。また反応液の浸透圧を生体物質に適した値に調整して行うこともできる。

【0021】本発明における生体物質に対するフェライトの固定は、フェライトめっきを用いているので、まず生体物質における鉄イオンの吸着サイト、例えば水酸基を有する位置にまず2価の鉄イオンが吸着結合され、次いでこの2価鉄イオン（の一部）が酸化されながらスピネル構造のフェライトとを形成してゆくので、フェライトの生成固定される位置が特定でき、しかもその固定は強固である。

【0022】本発明のフェライト固定生体物質は、生体としての活性を有するとともに、外部から磁気的に操作することができるので、多くの用途が可能である。

【0023】そうした多くの用途の中で、生体特異的親和性物質を選択的に捕捉するキャリヤあるいはバイオプローブとしての用途は重要なものの一つである。このような生体特異的親和性物質キャリヤの具体例としては、生体内的薬剤や内分泌搅乱物質などの化学物質に対して特異的に結合する生体内的受容体（レセプター）の同定や分離抽出に用いられる生体特異的親和性物質キャリヤがある。これは、化学物質にフェライトを固定することによって構成できる。

【0024】生体に与えられた化学物質は、生体中の特定の受容体と結合し、構造およびその機能が変換された上で生体に作用を及ぼす。このため、その特定の受容体を探索し、同定して化学物質とその受容体との関係を明

らかにすることが必要となる。なお、このような関係が明らかになり、外部刺激からの細胞内のシグナル伝達経路を解明できれば、例えば特定のシグナル伝達経路を標的とすることにより、薬効が大きく副作用の少ない新薬の開発や新規薬剤設計に役立てることができる。

【0025】本発明のフェライト固定生体物質の一実施形態である、化学物質にフェライトを固定したキャリヤを用いれば、このキャリヤを細胞液混合物と混合して混合物中に存在するこの化学物質の受容体をキャリヤに結合させた後、磁気分離を用いてキャリヤとともにこの化学物質の受容体を簡便に分離し抽出することができる。

【0026】細胞内にある受容体の中から特定の薬剤の受容体などの生体分子を分離抽出するには、従来はアフィニティクロマトグラフィが用いられてきたが、多くの手間や時間を要することから、最近では生体分子の新しい分離抽出方法として、特開平10-195099号公報に記載の分離抽出方法が開発され、用いられるようになった。

【0027】これは、スチレンーグリジルメタクリレート重合体のラテックス粒子にスペーサを介して特異的親和性を有する生理活性物質をリガンドとして結合したミクロスフィアをキャリヤとして用いたもので、効率的に分離抽出を行うことができ、大幅な迅速化、簡便化が実現している。

【0028】ところがミクロスフィアを混合物中から分離するには、遠心沈降などの沈降法が用いられ、沈降法には同時に沈降する夾雑物の混入に注意が必要である。これに対し本発明のフェライト固定生体物質を生体特異的親和性生体物質のキャリヤとして用いれば、磁気分離によりキャリヤを混合物中から分離することができる。遠心分離よりもさらに簡便かつ迅速に分離抽出が可能であり、しかも磁気分離により夾雑物の混入を回避することができる。

【0029】本発明のフェライト固定生体物質を用いた生体特異的親和性物質キャリヤは、磁気的に操作が可能であることを利用して、生体特異的親和性物質のライブラリの構築や特定の目的に添った生体特異的親和性物質のスクリーニングに用いることもできる。

【0030】また本発明のフェライト固定生体物質の用途として、先に述べた酵素免疫試薬として用いることができるほか、患部への薬剤の投与を擧げることができ。薬剤にフェライトを固定することにより、患部の患部への投与に際して磁気的に操作をすることができ、それによって薬剤を患部に集中させれば、薬剤を効率的に用いることができ、しかも治療後は余分なフェライト固定物質や使用済みとなったそれらの物質を磁石などを用いて磁気的に操作して回収することができるので、薬剤の副作用を低減することができる。

【0031】これらの用途において、薬剤物質やたんぱく質などの物質にスペーサを介してフェライトに固定してもよいし、また薬剤物質にフェライトを直接に固定し

てもよい。上記した本発明のフェライト固定生体物質の用途は、その具体例挙げたに過ぎない。従って本発明のフェライト固定生体物質の用途はこれらに限定されるものではない。

【0032】

【発明の実施の形態】次に本発明の実施の形態を実施例に基づいて具体的に述べる。なお以下の実施例は本発明の実施形態の例示をしたものであって、本発明はここに記載の実施例に限定されるものではない。

10 【0033】(実施例1) (アルブミンに対するフェライトの固定)

生体物質としてアルブミンの一種であるBSA(ウシ血清アルブミン、bovine serum albumin)を選び、このBSAにフェライトめっきによるフェライトの固定を行った。

20 【0034】

ここでフェライトめっきは次の条件で行った。BSAを有する液に反応液として塩化第一鉄(FeCl₂)および塩化第二鉄(FeCl₃)の水溶液を注入し、水溶液の温度を25℃の一定温度に保ち、水溶液の攪拌を行って空気中の酸素を取り込むことにより酸化を行った。この際、pHコントローラを用い、アンモニア水添加を行って、水溶液のpHを7に保った。こうして10分間のめっき処理によりフェライトの固定されたBSAを得た。

30 【0035】

フェライトの固定されたBSAの一部を取り出し、電子顕微鏡観察した結果、アルブミンにフェライトの固定がされていることが確認された。またこのフェライトの固定されたBSAのX線回折を行った結果、フェライト(スピネル構造のマグнетイト)の生成が確認された。さらにこのフェライトの固定されたBSAについて磁気測定を行った結果、保磁力および残留磁化がほぼゼロであり、超常磁性的な挙動を示すことが確認された。

【0036】(実施例2) (水酸基を導入したE3330アルブミンに対するフェライトの固定)

生体物質として、3-[5-(2,3-ジメトキシ-6-メチル-1,4-ベンゾキノニル)]-2-プロベン酸(リウマチや炎症反応などに関与する転写因子NFkBを選択的に阻害する薬剤3330(藤沢薬品)、以下、E3330と略称する)に水酸基を導入したOH-E3330を合成し、この水酸基にフェライトめっきを行ってフェライト固定OH-E3330を得た。このフェライト固定OH-E3330について、NFkBの転写活性化能の抑制をテストし、E3330と同様に免疫抑制を有することを確かめた。

40 【0037】

E3330に対するフェライトめっきは実施例1と同様の条件で行った。OH-E3330を有する液に反応液として塩化第一鉄(FeCl₂)および塩化第二鉄(FeCl₃)の水溶液を注入し、水溶液の温度を25℃の一定温度に保ち、水溶液の攪拌を行って空気中の酸素を取り込むことにより酸化を行った。この際、pHコントローラを用いるとともにアンモニア水の添加を行って、水溶液のpHを7に保った。こうしためっき処理によりフェライトの固定されたE3330を得た。

【0038】次にフェライトの固定されたE3330の一部を取り出し、電子顕微鏡観察した結果、フェライトの固定がされていることがわかった。またこのフェライトの固定されたE3330のX線回折を行った結果、フェライト（スピネル構造のマグネタイト）の生成が確認された。さらにこのフェライトの固定されたE3330の磁気測定の結果、保磁力、残留磁化とともにほぼゼロであり、超常磁性的な挙動を示すことが確認された。

【0039】（実施例3）（フェライトの固定されたE3330を用いた受容体の分離抽出）

次に実施例2で作製したフェライトの固定されたE3330を用いて受容体の分離抽出を行った。なお、以下の手順の詳細は特開平10-195099号公報に記載された方法に従った。

【0040】浮遊培養したJunker細胞の培養液を遠心分離して細胞を集め、洗浄して夾雑物を除いた。この細胞を膨張させ、細胞膜を破碎して細胞質画分と核画分とに分離した。次に核画分の核をほぐし、核内成分を抽出し、透析を行って核画抽出液を得た。

【0041】この核抽出液に上記のフェライトを固定したE3330を混合し、放置して、このE3330に特異的に結合する物質の結合をさせた後、ネオジウム磁石を用いて磁気分離を行って、フェライトを固定したE3330の分離を行った。分離したフェライト固定E3330は洗浄と磁気分離を2回繰り返し、このE3330に結合した生体物質であるE3330の受容体を分離抽出し、KClを含んだバッファ溶液で解離させ溶出させて受容体を抽出した。この受容体について電気泳動法による測定を行い、分子量約38kDaのたんぱく質バンドを確認した。

【0042】これによって、フェライトを固定したE3330を用いて核内レドックスたんぱく質Ref-1が抽出できたことがわかった。なお、Ref-1は核内でNFKBを還元して、そのDNA結合能を亢進し、活性化するものである。E3330は生体内でこのRef-1に選択的に結合することにより、その還元活性を阻害する。

【0043】（実施例4）（DNAに対するフェライトの固定）

発生や長期記憶などの生命現象に関与し、同じ塩基配列を認識する複数個の転写因子群から構成されるCREP/ATF (cAMP responsible element binding protein / activating transcription factor) の結合配列を複数個をタンデムに持ち、末端に1本鎖を設けたDNAを調製した。このDNAの末端に、水酸基を有するスペーサを接続し、このスペーサの水酸基の部分に上記実施例1および2で述べたフェライトめっきを行ってフェライトを固定して、フェライトの固定されたDNAを得た。このフェラ

イトの固定されたDNAの磁気測定の結果、保磁力および残留磁化がほぼゼロであり、超常磁性的な挙動を示すことが確認された。

【0044】（実施例5）（フェライトを固定したDNAを用いた生体物質の分離抽出）

実施例4で作ったフェライトの固定されたDNAとHeLa細胞核抽出液を混合し、生理的条件下で結合反応を行った。この後磁気分離による分離と緩衝液を用いた洗浄を繰り返すことにより、容易にフェライトが固定され生体物質を結合したDNAを分離精製することができた。続いて緩衝液の塩濃度を高めることにより、フェライト固定DNAに結合した生体物質を解離することができた。こうして得られた生体物質について同定を行い、CREB/ATPであることを確認した。

【0045】この結果、CREP/ATFの結合配列を複数個をタンデムに持ちフェライトの固定されたDNAを用いることにより、CREB/ATPの分離抽出ができることがわかった。

【0046】

【発明の効果】フェライトめっきを用いることにより、生体物質の活性を保ったまま、生体物質にフェライトを形成し固定することができるようになった。こうしてフェライトを固定した生体物質は、生体特異的親和性物質を選択的に捕捉し、磁気分離することのできるキャリヤとして用いることにより、生体物質の分離精製操作を大幅に簡易化することができる。また生体特異的親和性物質のライブラリの構築やスクリーニングに用いてその簡易化を行うこともできる。

【0047】また本発明のフェライト固定生体物質は患部への薬剤の投与に用いることができる。薬剤にフェライトが固定されていることにより、薬剤を磁気的に患部に誘導することができ、薬剤を患部に集中させ、他への薬剤の拡散を防ぐことにより、薬剤の副作用を防止することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のフェライト固定生体物質の一実施形態を模式的に示す図である。

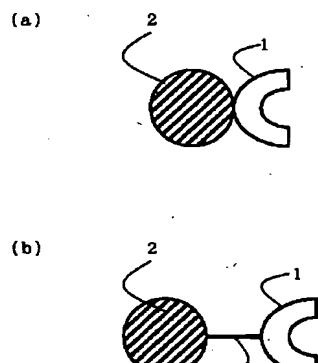
【図2】 本発明のフェライト固定生体物質の製造方法を模式的に示す図である。

【図3】 球状粒子にフェライトを固定し、そのフェライト表面に生体物質を固定した従来の試薬を模式的に示す図である。

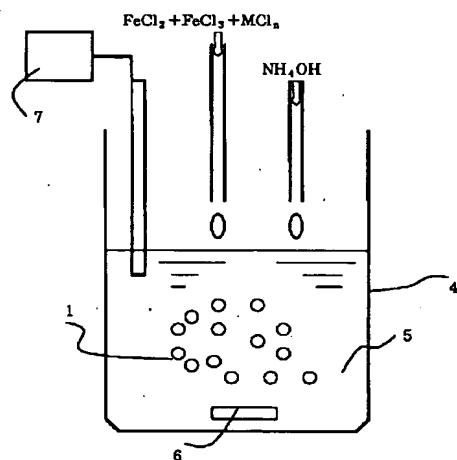
【符号の説明】

1 ……生体物質、 2 ……フェライト、 3 ……スペーサ、 4 ……容器、 5 ……反応液、 6 ……スター、 7 ……温度/pHコントローラ。

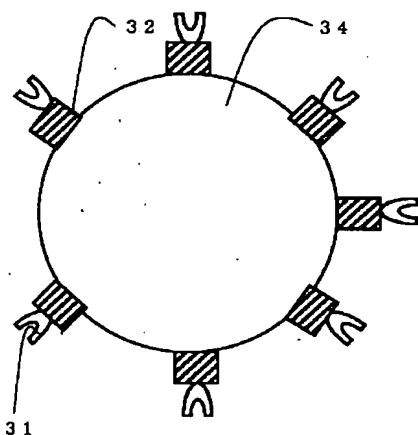
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 西村 一寛
東京都目黒区大岡山2-12-1 東京工業
大学内

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB16
BB17 BB20 CC03 FA15
4B033 NA22 NA42 NA43 NA45 NB02
NB12 NB22 NC04 NC12
4B063 QR82